Lane Medical Library

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Giessen.
Direktor: Professor Georg Herzog.

1929

Kritische Betrachtungen über die Verwendung verschiedener Nährmedien bei der Gewebezüchtung.

DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät

der

Hessischen Landesuniversität zu Giessen

vorgelegt von

Otto Kraus
approb. Arzt aus Bayreuth.

Giessen 1929

Verlagsdruckerei Albin Klein in Giessen
vorm. Wilhelm Keller, gegr. 1783.

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät Giessen.

Omnis cellula e cellula. Seit dieser von dem genialen pathologischen Anatomen Rud. Virchow aufgestellten und die bis dahin bestehenden Theorien zum großen Teile umstoßenden Feststellung beschäftigt das Zellgeschehen die Wissenschaft auf das allerstärkste. So entstand aus dem Bestreben heraus, den Vorgängen in der einzelnen Zelle nachzuspüren, das Verfahren der Explantation, der Loslösung der Zelle aus ihrem Organismus und Weiterzüchtung derselben in einem Medium, das alle für das Weiterleben außerhalb des Zusammenhanges notwendigen Nährstoffe und Substanzen enthält und so nicht nur Zellerhaltung, sondern echtes Zelleben mit Auswanderung, Zellteilung und Zellwachstum garantiert. Geleitet von dem Bestreben, dasjenige Nährmedium zu finden, welches alle entsprechenden Stoffe enthält und in dem der Selbstverbrauch der in den Explanaten enthaltenen wachstumsfördernden Stoffe auf ein Minimum herabgedrückt wird, griff man zu den verschiedenartigsten Lösungen.

Zuerst glaubte man die schon aus der Physiologie bekannten Lösungen, wie Ringer'sche Lösung, Kochsalzlösung, verwenden zu können. Aber bald ging man zu anderen Mitteln, zu der Verwendung von körpersaftähnlichen Flüssigkeiten oder von Körpersaft selbst über. Denn, handelte es sich nur um die oben genannten Lösungen, so mußte man bald die Erfahrung machen, daß die Zellen schon nach kürzester Zeit nicht nur kein weiteres Wachstum zeigten, sondern sogar zum Absterben verurteilt waren. Ebenso wie diese Versuche brachte auch die Verwendung von Lymphe durch Roux nicht den erstrebten Erfolg; es wurde auch hier nur eine Erhaltung des Zellebens, aber kein Wachstum der eingesetzten Gewebestückchen erzielt. Außerdem brachte die Gewinnung der notwendigen Lymphmengen erhebliche Schwierigkeiten mit sich. Da war es nun Harrison, der die für die Weiterentwicklung der Explan-

tation grundlegende Feststellung machte, daß die Gewebezelle zur Aufrechterhaltung ihres Lebens einer Stütze oder eine Gerüstes bedürfen, wofür am besten das im Plasma sich bil dende Gerinnsel und im stützsubstanzlosen Medium z. B. scho die Deckglasoberfläche, Oberfläche eines Flüssigkeitstropfens Spinngewebegerüst, Seidenfasern, Wollfaden und anderes ähn liches Material Verwendung findet. Weiterhin steht dann da mit die Wachstumform der Zellen in engstem Zusammenhange je nachdem als Stütze zweidimensionales z. B. Deckglas ode dreidimensionales z. B. Fibringerinnsel in Anwendung komm Die Abhängigkeit geht so weit, daß die Zellform durch de soliden Stützapparat festgelegt wird, wofür Leo L o e b de Ausdruck „Stereotropismus" prägte.

Da es sich nun zeigte, daß das Zellwachstum in den ver schiedenen Lösungen bezw. Medien oft ein ganz verschiedene war und je nach Konzentration, p_H Gehalt, chemischen un chemisch-physikalischen Charakter langsames bezw. schnellere Wachstum, evtl. sogar zellverschiedenes Wachstum beobachte wurde, dürfte eine Zusammenstellung der verschiedenen von genommenen Gewerbezüchtungen und der mit den verschiede zusammengesetzten Medien jeweils erreichten Erfolge lohnen

Aus naheliegenden Gründen benutzte man vor allem so genannte natürliche Kulturmedien. In erster Linie kommt da für das Blutplasma in Betracht. Weiterhin wird Blutserum Gewebeextrakt und Kombinationen dieser Stoffe untereinande oder mit anorganischen Stoffen verwendet. Ebeling z. B. stellt eine Mischung von Fibrinogen-Serum-Embryonalextrakt zu sammen, die die wachstumfördernden, aber auch die wachstum hemmenden Substanzen in besonders hohem Maße enthalte Wesentlich soll noch sein, daß es sich um autogenes Plasm handelt, um Plasma also, das demselben Tiere angehört, den die zu explantierenden Organe entnommen werden sollen Doch bestätigt eine Reihe von Versuchen, daß auch homogene Plasma, gattungsgleiches Plasma mit einigen Ausnahmen die selben Erfolge zeitigt. Dagegen erwies sich die Verwendun heterogenen Plasmas als Kulturmedium, also Plasmas einer an deren Art zugehöriger Tiere, für den Erfolg, wenigstens tei weise, fraglich (C a r r e l , B u r r o w s). Eine Ausnahme bilde hier nur Ca und Sarkomkulturen, die gerade in artfremde Plasma am besten angehen. Ein Zusatz arteigenen Gewebe

extraktes soll auf das Zellwachstum sehr wirksam sein (Krontowski).

Auf Grund dieser Beobachtungen und der Tatsache, daß man theoretisch Gewebekulturen bei entsprechender Sorgfalt in's Unendliche zu züchten vermag, verwendet man jetzt fast ausschließlich autogenes bezw. homogenes Plasma. Um nun ein Optimum des Kulturmediums herauszuklügeln, stellte man die verschiedenartigsten Versuche an: Zusätze von Medikamenten, Metallen, Chemikalien, Mischungen mit anderem Plasma usw.

Andererseits wurden aber auch durch Anwendung sogenannter künstlicher Nährmedien bei gewissen Arbeiten, vor allem von den beiden Lewis Erfolge, d. h. einwandfrei nachweisbares Zellwachstum erzielt. Von diesen Autoren werden ja auch die wesentlichsten dafür in Frage kommenden Lösungen angegeben, die hier aufgeführt werden sollen, um mit der Bezeichnung sofort einen festumrissenen Begriff verbinden zu können.

Physiologische Kochsalzlösung für Kaltblüter:

Na Cl	0,7 g
Aqua dest.	100,0.

Locke-Lewis Lösung für Kaltblüter:

Na Cl	0,7 g
KCl	0,042 „
$Ca\ Cl_2$	0,025 „
$Na\ H\ C\ O_3$	0,02 „
Dextrose	0,25 „
Aqua dest.	90,0 ccm

Locke-Lewis Lösung für Warmblüter:

Na Cl	0,9 g
$Ca\ Cl_2$	0,024 „
KCl	0,042 „
$Na\ H\ C\ O_3$	0,02 „
Dextrose	0,5 „
Aqua dest.	100,0 ccm

Zu 80 ccm dieser Lösung wurden 20 ccm Hühnerbouillon zugegeben. Es hat nun die Lösung, deren Wasserstoffionenwert zwischen $p_H = 6{,}8$ und $p_H = 7{,}2$ spielt, den Vorteil, daß man durch Zusatz von etwas mehr oder weniger Wasser eine hypotonische bezw. hypertonische Lösung erzielen kann. Aber

bald zeigte es sich, daß die Lebenserscheinungen und Lebensdauer der Gewebe in dieser Lösung beschränkt waren — ein bis 14 Tage —, da eben der Eigenverbrauch der in den eingesetzten Gewebestücken selbst enthaltenen notwendigen lebensfördernden Substanzen ein zu großer war, so daß sich das Gewebe, durch sich selbst ernährt, zu rasch aufbrauchte. Dazu kommt dann noch das Fehlen eines mediumeigenen Stützapparates. Und selbst bei Zusatz organischer Substanzen wie Agar, Fleischbrühe, Dextrose, die zwar ihren Wert erhöhen, blieben sie in ihrer Verwendungsfähigkeit als Medium weit hinter dem Plasma zurück. Aus diesem Grunde sind die Gewebezüchtungsversuche mit diesen Mitteln nur spärlich und ging man dazu über, diese Lösungen und die Modifikation derselben (Ringer'sche Lösung nach Vernon, Tyrode-Lösung, Drew'sche Lösung und eine davon abgeleitete Lösung nach Paneff und Compton, Lösung 753 nach Liesegang) in der Hauptsache als Zusatz zu anderen Medien, als Aufbewahrungsmittel für Organfragmente auf kürzere Zeit und besonders aber als Spülungsmittel zum Auswaschen umzusetzender Kulturen zu verwenden.

Trotzdem bedienten sich L e w i s M. und L e w i s W., eben so wie M a t s u m o t o, mit Vorliebe der Locke-Lewis-Lösung, der 0,25% Dextrose und 10% Hühnerbouillon zugesetzt werden. Selbst gewöhnliches Meerwasser fand bei Lewis Verwendung. Immer jedoch bestätigten diese wie auch der folgende Versuch von Lewis und Lewis die bestehende Tatsache, daß das Leben der Kulturen in solchen Lösungen als Nährmedium eine nur stark begrenzte Dauer besitzt. Sie setzten Stückchen embryonalen Hühnergewebes in Locke-Lewis-Lösung ein, der 0,5% Dextrose zugesetzt war. Es entwickelten sich Fibroplasten, Klasmozyten, öfter ektodermale Membranen und Muskelknospen. Doch war nach 96 Stunden in den allermeisten Fällen schon Gewebetod eingetreten, nachdem nach 48 Stunden die Kulturen ihr Optimum erreicht hatten und nach 72 Stunden bereits viele Zellen Degenerationserscheinungen hatten erkennen lassen. Am schnellsten trat der Tod in den Kulturen ein, die keine Mitosen zeigten. In den übrigen Kulturen konnten solche nach 24, 48 und 72 Stunden leicht gesehen werden.

Die relativ kurze Lebensdauer der Gewebestücke soll nun keineswegs eine Begründung der absoluten Unbrauchbarkeit der zur Verwendung gekommenen Lösungen sein. Im Gegen-

teil. Denn es gelingt ja damit, uns wichtige Vorgänge des Zellgeschehens näher zu bringen wie z. B. die Degenerationserscheinungen, zumal durch vorgenommene Vitalfärbung die einzelnen Phasen der menschlichen Beobachtung gut zugänglich gemacht werden konnten. Von Vorteil ist dabei noch die absolute Durchlässigkeit des Mediums. So brachte dieser Versuch den einwandfreien Unterschied zwischen Degenerationsgranula und Mitochondrien, worauf hier jedoch nicht weiter eingegangen werden soll. Aber auch noch andere wichtige Fragen über Degenerationsveränderungen, besonders über die Vakuolenbildung, konnten durch diese Versuche zur Diskussion gebracht werden. Entstehen dieselben als Folge des Metabolismus, als Reaktion auf Toxine, z. B. des Bacillus typhosus, oder sind sie, wie dies Rh. Erdmann annimmt, lediglich Zeichen des Zellhungers? Es führen somit Versuche mit anorganischen Medien, die eigentlich nur als lebenserhaltend angesehen werden können, zu einer Reihe wichtiger Feststellungen. Ein Urteil über ein Medium, ob gut, ob schlecht, kann also nur ein relatives sein. Abhängig ist es letzten Endes von der Art des Versuches und vor allem vom erzielten Erfolg.

Erwähnung bedürfen hier noch die Versuche mit hypertonischen und hypotonischen Lösungen. Auf Grund der Erfahrungen, die bei den diesbezüglichen Versuchen von Hogue, Uhlenhuth, Carrel und Burrows, Ruth, Lambert, Ebeling und den beiden Lewis gemacht wurden, ergibt sich mit kurzen Worten folgendes: Im hypotonischen Medium geht die Zellauswanderung heftiger vor sich als in hypertonischem Medium. Die Lebensdauer der Kulturen sowohl in hypotonischen als auch in hypertonischen Lösungen ist kurz gegenüber der in isotonischen Lösungen, doch ist sie länger in hypertonischen Lösungen als in hypotonischen Lösungen, während der ausgewachsene Schleier in hypertonischen Lösungen kleiner ist als in hypotonischen Lösungen. Wichtig an diesen Versuchen mit solchen Lösungen ist neben vielen anderen gemachten Beobachtungen die Tatsache, daß extremitätenartige Zellausstülpungen experimentell erzeugt werden konnten, wie dies z. B. bei den Amöben schon lange Zeit beobachtet worden war.

Welchen Einfluß der Verflüssigungsgrad des Mediums auf die Zellgestaltung ausübt, zeigen die Arbeiten Uhlenhuths,

in denen er die Zellvermehrung und Umbildungsmöglichkeiten des Epithels eines erwachsenen Frosches — Rana pipiens — zu ergründen sucht. Als Gewebe kamen kleine, aus der Rückenhaut des erwachsenen Frosches geschnittene Stückchen zur Verwendung. Epithel und Cutis wurden in das Kulturmedium, nämlich Froschplasma, verpflanzt. Bei Parallelversuchen setzte Uhlenhuth dem Froschplasma noch Hühnerplasma oder Muskelextrakt zu. Ferner verwendete er heterologes Plasma allein oder unter Zusatz embryonalen Hühnerextraktes. Es gelang ihm in allen Fällen zu zeigen, daß die um das implantierte Gewebestück dicht gelagerten Epithelzellen bei zunehmender Verflüssigung immer mehr und mehr Spindelform annahmen, eine Form, die er mit dem Begriff Bindegewebszelle in Verbindung bringt. Neben anderen interessanten Feststellungen mag hier genügen, daß mitotische und amitotische Vermehrung des Epithels der explantierten Froschhaut beobachtet werden konnte.

Uhlenhuth erweiterte diesen Versuch insofern, als er feste, halbflüssige und flüssige Medien verwandte und so experimentell Veränderungen der Zellform herbeiführen konnte. Als Gewebe dient abermals Epithel der Froschhaut. Zur Verflüssigung der Medien wurde Muskelextrakt und Augenkammerwasser zugesetzt. Im festen Medium fand keine getrennte Zellauswanderung statt, die Zellen schoben sich im Zusammenhang, sei es durch Zellteilung, sei es durch Zellwanderung, langsam in das Plasma vor. Von oben gesehen, erschienen sie stets polyedrisch oder polygonal. Im halbflüssigen Medium wurden langgestreckte, faden- und spindelförmige Gebilde beobachtet. Die Haut des Frosches verteilte sich in einzelne kleine Inseln, Vakuolen bildeten sich an manchen Stellen, und feine Zellbalken schoben sich in das Plasmamedium nach allen Seiten vor. Ganz flüssiges Medium förderte die Gestaltung runder Zellen. Diese Arbeit zeigte, daß rein mechanische Faktoren, eben die jeweilige Konsistenz des Mediums, für die Zellform wichtig sind.

Günstiger verhält es sich mit den sogenannten „gemischten" Nährmedien, die teils organische, teils anorganische Stoffe enthalten. Es werden hier den Salzlösungen in den mannigfaltigsten Verhältnissen Plasma und Gewebeextrakt beigegeben. Es ist hier nur genauestens auf die großen Schwankungen unterworfene p_H Stabilität Rücksicht zu nehmen. So sinkt z. B. das

p_H = 7,2 des frischen Embryonalextraktes binnen kurzer Zeit nach Ebeling auf 6,5, wo es dann allerdings für längere Zeit stabilisiert.

Im Laufe weiterer Untersuchungen über wachstumsfördernde Substanzen fanden Carrel gemeinschaftlich mit Baker, daß gewisse Eiweißabbauprodukte, Proteosen, als wachstumsfördernde Substanzen dienen und bei der Gewebezüchtung den Embryonalextrakt weitgehendst zu ersetzen vermögen: Kuczinski hatte früher schon Pepton zugesetzt, jedoch mit dem prinzipiellen Unterschied gegenüber den beiden anderen Forschern, geringere Konzentrationen als diese benutzt zu haben, so daß sein Peptonzusatz mehr stimulierend gewirkt hat, während die Proteosen von Carrel und Baker Nährstoffe darstellen, die theoretisch ein unbegrenztes Leben von Gewebekulturen in vitro ermöglichen. Es ist dies von großem praktischen Wert für die Gewebezüchtung. Einmal erfährt sie durch die Einschränkung des Haltens von Eiern im Brutschrank eine Verbilligung und dann kann durch die Benutzung einer in beliebiger Menge herstellbaren, einigermaßen chemisch definierten und jedenfalls konstanten Substanz Standardisierung eines Teiles des Züchtungsmediums erreicht werden. Diese letztere Tatsache führt vor allem zu wichtigen Erkenntnissen für die Gewebephysiologie in vitro und die Charakterisierung und die Bedeutung der wachstumsfördernden Substanzen.

Im Anschluß an ähnliche Versuche kam Fischer auf Grund der Beobachtungen, daß Gewebekulturen, die zufällig inficiert sind, — wenn nur die Bakterienkolonien das Medium nicht ganz überschwemmen — besonders gut wachsen, also wachstumsfördernde Substanzen enthalten müssen, auf die Idee, Bakterien zur partiellen Verdauung von Pepton zu verwenden. Die angestellten Versuche führten zu dem erwarteten Erfolg. Bisher wurden längere oder kürzere Zeit folgende Gewebe unter Verwendung dieses Zusatzmittels mit Erfolg gezüchtet: Hühnerfibroplasten, Hühnermonozyten, Hühnermilz, Hühnersarkom, Hühnerknorpel, Hühnergallenblasenepithel, Mäusesarkom, Rattencarcinom, Menschenovarium.

Das erste, allen Anforderungen entsprechende und auch heute noch meist verwandte Verfahren schufen nach langen Versuchen Harrison und Carrel. Unter dieser Bezeichnung ist diese Methode auch in der Literatur eingeführt worden.

Sie verwendeten Blutplasma, das unter bestimmten Bedingungen gewonnen worden ist. Am wesentlichsten dabei ist rasches, vollkommen aseptisches Arbeiten mit dem unbedingten Bestreben einer Gerinnungsverhinderung. Dies gelingt unter Verwendung paraffinierter Gefäße, die außerdem noch eisgekühlt werden. In diesem seiner Zusammensetzung nach isotonischen Medium, das naturgemäß alle Bestandteile des Blutes enthält, nur ganz langsam austrocknet, für das Zelleben unschädlich ist und wegen seiner Durchsichtigkeit auch in geronnenem Zustande genaue Beobachtung der lebenden Zelle gestattet, züchtete Carrel 28 Monate lag ein Stückchen embryonalen Hühnerherzens, indem er die Kultur stets in ein erneuertes Medium umsetzte, und Ebeling, der diesen Versuch fortsetzte, konnte bis heute Wachstum und Zellteilung, also echtes Zelleben, beobachten.

Die Blutplasmagewinnung nach der Eis-Paraffintechnik (Burrows) bietet jedoch trotz gewissenhaftesten Arbeitens eine Menge von Schwierigkeiten, da die Gerinnung eben doch allzu leicht eintreten kann. Am günstigsten wegen der ihm eigenen Stabilität ist noch das Hühnerplasma, das sich mehrere Wochen lang aufbewahren läßt, während dagegen Ratten- oder Meerschweinchenplasma weit schwerer zu behandeln ist. Um nun den Nachteil des Plasmas — seine schwere Handhabung — zu vermeiden, suchte man nach gerinnungshemmenden Stoffen, durch deren Zusatz es jedoch zu keiner Schädigung der eingepflanzten Kulturen kommen durfte. So wurde von Foot (1916) das sogenannte Zitratplasma angegeben, mit dem es gelang, menschliche Tumoren mit gutem Resultat zu züchten. Aufbewahren ließ sich dasselbe 1 bis 2 Wochen. Bei seiner Anwendung wurde es zu gleichen Teilen mit einer die zehnfache Menge an $CaCl_2$ enthaltenden Locke-Lösung versetzt. Aehnlich war das von Krontowski und Poleff angegebene Oxalatplasma und seine Anwendung.

Diese Mittel hatten aber von vornherein den Nachteil der Salzhaltigkeit in sich und war die Technik trotz der erreichten Vorteile immer noch mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Alle diese Nachteile und Schwierigkeiten fielen mit der Einführung der Heparinplasmamethode durch E. C. Craciun weg.

Heparin ist ein von W. H. Howell und E. Holl aus der Hundeleber extrahiertes und seiner Wirkung nach ein Antiprothrombin darstellendes Mittel. Da es außerdem von Howell

auch im strömenden Blute des Hundes, der Katze und des Menschen nachgewiesen werden konnte, besteht die sicher berechtigte Auffassung, Heparin als einen für Säugetierblut normalen und physiologischen Stoff zu betrachten und demzufolge dem Heparin für die Gewebezüchtung in vitro eine Ausnahmestellung unter den gerinnungshemmenden Stoffen zuzuweisen.

Wird ein Heparinplasmaextrakttröpfchen auf ein Deckglas gebracht, so gerinnt es in der Regel erst dann, wenn ihm ein Gewebestückchen zugesetzt wird, eine große Erleichterung gegenüber dem Arbeiten mit nicht so vorbereitetem Plasma, welches ja schon bei den geringsten Temperaturschwankungen im Aufbewahrungsröhrchen koaguliert. Bei einer damals (1927) einjährigen Erfahrung konnte E. H a g e n , eine genügende Verdünnung vorausgesetzt, keine Beeinflussung des Wachstums in ungünstigem Sinne von in Heparinplasma gezüchteten Kulturen durch das Hormon jemals feststellen. Es ist zweckmäßig, nicht mehr als 0,5 ccm einer Lösung von 1:1000,0 auf 10,0 bis 15,0 Blut zu verwenden. Auch aus allen übrigen Laboratorien, in denen mit Heparin gearbeitet wurde, liegen keine nachteiligen Berichte vor.

Während man in den ersten Anfängen der Gewebezüchtung annahm, daß man nur autogenes und homogenes Plasma in Anwendung bringen könne, zeigt jetzt eine Reihe von Versuchen deutlich, daß praktisch jedes Plasma, wenigstens für kürzere Zeit, zur Züchtung gebraucht werden kann, wenn es nicht gerade toxische Wirkung auf das eingepflanzte Gewebestück ausübt. Dabei hängt die toxische Wirkung nicht von der weiteren oder näheren Verwandtschaft des blutliefernden und des gewebeliefernden Tieres ab, sondern die in gewissen species- und artfremden Plasma enthaltenen Toxine wirken abtötend auf die Zellen vergleichsweise der haemolytischen Wirkung verschiedener Sera auf Blutkörperchen mehr oder minder ver wandter Tiere.

So gelang es beispielsweise in Katzenplasma keinerlei Wachstum eingepflanzten Taubengewebes zu erzielen, während z. B. Rattengewebe in Schildkrötenplasma mit ausgezeichnetem Erfolg gezüchtet werden konnte.

Ueber die Anwendung von autogenem, homogenem und heterogenem Kulturmedium wurde noch ausgiebig von C o l l i n , C h l o p i n und vor allem von I n g e b r i g t s e n gearbeitet. Als

Gewebe verwendete Ingebrigtsen Knochenmark. Später dehnte er seine Untersuchungen auch auf andere Gewebe aus und stellte Versuche an, unter den verschiedensten Bedingungen embryonales als auch erwachsenes Gewebe zu züchten.

Als Medium kam 2%iger Agar, Serum + 2%iger Agar und schließlich homogenes und heterogenes Plasma in Anwendung. Als Gewebe benutzte Ingebrigtsen zuerst embryonale Hühnerleber. Weiter kamen noch Milz, Peritoneum, Herz und Bindegewebe zur Züchtung. Es zeigt sich nun, daß das embryonale Zellgewebe gutes Wachstum sowohl in den Salzlösungen, die versuchsweise mitverwendet wurden, als auch in den organischen Medien zeigte, während erwachsenes Gewebe sich nur in Plasma vermehrte.

Diese Tatsache berechtigt zu dem Schluß, wie ja auch schon oben gezeigt, daß das embryonale Gewebe in sich selbst genügend Reservekräfte hat, um eine Zeitlang echtes Weiterleben mit Wachstum und Zellteilung ermöglichen zu können. Und so wird es auch klar, daß in anorganischen Lösungen nur ein zeitlich begrenztes Weiterleben stattfinden kann, und zwar nur so lange, als Eigenkräfte zur Verfügung stehen. Es ergibt sich also aus diesen und weiterhin auch aus den von Rh. Erdmann und Goldschmidt angesetzten Versuchen, daß das Plasma und davon wieder weibliches — warum ist nicht geklärt — allen anderen vorzuziehen ist. Einen die erwähnten Versuche bestätigenden Verlauf nahmen auch die von Lambert und Hanes durchgeführten Tumorenzüchtungen von Ratten und Mäusen abwechselnd im Plasma dieser beiden Tierarten. Außerdem trat bei diesem Versuch die Ueberlegenheit des specieseigenen gegenüber dem speciesfremden Plasma klar zutage.

Dem gegenüber müssen die Arbeiten Nikolaus G. Chlopins Erwähnung finden. Er sah sich durch Verwendung von Axelotle-Explantaten wegen der Schwierigkeiten und der großen Umständlichkeit größere Blutmengen dieser Versuchsobjekte zu bekommen und wegen der höchst unbequemen Eigenschaften des Blutes selbst auf homologes Nährmedium zu verzichten und ein geeignetes artfremdes Plasma zu suchen. Als solches hat sich nun vor allem das Kaninchenblutplasma erwiesen, welches sowohl leicht erhältlich ist, als auch für das Experimentieren bequeme Eigenschaften hat — in paraffinierten Gefäßen in Kälte (bei 0 Grad) genügend lange Zeit flüssig aufbewahrt werden

kann, nach Verfertigung der Präparate aber schnell gerinnt und einen gleichmäßigen, gallertartigen Tropfen bildet, dessen Konsistenz gutes Zellwachstum ermöglicht. Da der osmotische Druck des Kaninchenblutplasmas bedeutend größer ist als derjenige der Gewebesäfte niederer Vertebraten und das Nährmedium durch Verdunstung während der Prozeduren stets auch noch etwas konzentrierter wird, wurde das Blutplasma mit einem gleichen Volumen sterilen destillierten Wassers verdünnt und dadurch gegenüber dem zu untersuchenden Tiergewebe etwas hypotonisch gemacht. Die Kulturen wurden zum Teil in dem verdünnten Blutplasma, zum Teil unter Zusatz von Milzextrakt (2 Tropfen Plasma + 1 Tropfen Extrakt) angelegt. Der Milzextrakt wurde durch Verreiben der Milz mit isotonischer Ringerlösung mit nachträglichem Zentrifugieren angefertigt. Bei dem Vergleich der Plasmakulturen mit den Plasma-Extraktkulturen stellte es sich heraus, daß der Zusatz des Extraktes keinen bedeutenden stimulierenden Einfluß auf das Wachstum der Zellen in vitro hatte. Sämtliche Kulturen, die nach der üblichen Deckglasmethode im hängenden Tropfen angefertigt waren, zeigten trotz des heterogenen Nährmediums gutes Wachstum.

Ein weiterer Versuch von Lambert und Hanes berichtet über die Verschiedenheit des Zellwachstums von je einem Rattensarkom, je einem Mäusesarkom und einer Mäusemilz in Meerschweinchen-, Hunde-, Ziegen-, Tauben- und Menschenplasma. Nach 30 Tagen zeigten die Zellen des Rattensarkoms noch Auswanderung, wenn sie in frisches Meerschweinchenplasma umgesetzt wurden. Weniger wachstumsfördernd war das Kaninchenplasma, in dem trotz häufigen Mediumwechsels nur bis zum 12. Tage Wachstum zu beobachten war. In Hundeplasma hielt das Wachstum nur 3 Tage an, im Taubenplasma war solches etwas länger nachweisbar. Vollkommen unbrauchbar war das Ziegenplasma, während im menschlichen Plasma nur ganz geringe Zellauswanderung und Bildung einiger Riesenzellen stattfand, die in besonders reichlichem Maße bei der Züchtung von Milzgewebe auftraten. Die eingetretene Zellschädigung verhinderte eine Fortsetzung der Züchtung, da sich nach Ansicht der Forscher Antotoxine gegenüber dem Rattensarkom im Ziegenplasma gebildet hatten.

Von Losse und Ebeling konnte menschliches embryo-

nales Bindegewebe aus dem Herzen eines 4 bis 6 Monate alten Foeten 2 Monate lang gezüchtet werden. Es hatte das Aussehen vom Typus der Spindelzelle des Hühnermesenchyms, nur wuchs es nicht ganz so dicht wie das Hühnergewebe. Nach der angegebenen Zeit trat jedoch die das Zellwachstum verhindernde Verflüssigung des Mediums — Menschplasma + foetaler Gewebeextrakt zu gleichen Teilen — ein. Weitere Kombinationen — Agar + Plasma — führten zu einem besseren Erfolg.

Diese teilweisen Mißerfolge veranlaßten zur Herstellung weiterer kombinierter Medien. E b e l i n g benutzte bei einigen Versuchen Hühnerplasma + embryonalen Muskelextrakt, Congdon 2 Teile Aqua dest. + 1 Teil Plasma, U h l e n h u t h Froschplasma und Froschmuskelextrakt oder Augenkammerwasser. Je weitere Fortschritte die Explantation machte, desto mehr jedoch verlegte man sich auf die fast ausschließliche Verwendung homogener, in der Mehrzahl der Fälle noch besser autogener Medien. So hat auch G o l d s c h m i d t bei seiner Arbeit zur Erforschung der Spermatogenese, wozu er die Hodenzellen der Schmetterlingspuppe Senia cecropia als Material und als Medium die Blutflüssigkeit dieser Puppe benutzte, einen vollen Erfolg erzielt. C h a m p y züchtete kleine Stückchen der Prostata eines Meerschweinchens in Samenblasenflüssigkeit. Nach kurzer Zeit koagulierte die Flüssigkeit. Erst bei der Verwendung von Meerschweinchenplasma, also homogenem Plasma, gelang die Lebenderhaltung und konnte echtes Wachstum erreicht werden.

Der Vorzug des autogenen und homogenen Plasmas trat auch bei den Versuchen A. R u m j a n t z e w s klar zutage, der für seine Versuche Kulturen einer ausgewachsenen Rana temporaria und einer jungen einjährigen Rana esculenta anlegte. Als Organe wurden Milz, Leber, Niere und Harnblase benutzt, als Nährmedium für Tier 1 autogenes, für Tier 2 homo- und heterogenes Plasma unter Hinzufügung eines Extraktes aus der Milz. Es zeigte sich, daß im Vergleich mit dem heterogenen Plasma das Wachstum der Froschgewebe in autogenem und homogenem Plasma mit dem Beginn des Aufblühens der Kultur am 4. bis 6. Tage unvergleichlich schneller erfolgte.

Die vielen und guten Erfolge mit homogenem Plasma, das dem autogenen kaum nachstehen soll, ließen auch S s i p o w s -

k y bei seinen Versuchen Kaninchennebenniere in vitro zu züchten, zu diesem Medium greifen. Zur Verbesserung des reinen Blutplasmas fügte er demselben noch etwas Extrakt aus Knochenmark und Milz hinzu. Als Untersuchungsobjekte dienten Nebennieren 3 bis 8 Wochen alter Kaninchen, die unmittelbar nach Tötung des Tieres entnommen wurden.

Bei der Züchtung von Rattenmilz zeigt sich gutes Wachstum der Kulturen, die in Ringer'scher Lösung gewaschen waren und in homogenes Rattenplasma eingesetzt wurden. Dabei ergab sich, daß Zusatz von Gewebeextrakten, überhaupt wachstumsfördernder Stoffe sich erübrigt, sofern nicht ganz alte Milzen genommen wurden, da die Milz ein Organ sein muß (auf Grund aller in dieser Hinsicht gemachten Erfahrungen), das wachstumsfördernde Substanzen in sich birgt. Im Rahmen einer von Rh. E r d m a n n , E i s n e r und L a s e r angestellten Untersuchung wurde dem normalen Rattenplasma, das allein ohne einen Zusatz wegen seiner Dünnflüssigkeit und seiner Neigung zu sehr rascher Gerinnung nur zur Züchtung von Milzgeweben geeignet ist, Färbemittel und auch Tumorplasma, d. h. Plasma von einem mit einem Tumor behafteten Tiere, zugesetzt. Es wurde dabei dem normalen Plasma bei der Herstellung der Explantate Karmin beigegeben in einem empirischen Verhältnis, wie es etwa der Karminmenge entsprechen würde, die durch 8tägige vitale Karminspeicherung (nach Kijono) in dem Plasma des Versuchstieres erzeugt wird. Es ergab sich jedoch, daß das frisch zugesetzte Karmin nicht so gut vertragen wurde wie das Karmin, das den Körper des lebenden Tieres passiert hat und das noch in dem sogenannten Karminplasma enthalten ist. Bei der später vorgenommenen Züchtung von Milzstückchen karmininjizierter Tiere in Normalplasma mußte man ebenfalls die Beobachtung einer Zellschädigung infolge des starken Reizes durch die vitale Karmininjektion machen. So kam man, um diesem Mißstande abzuhelfen, auf folgendes wirklich schonendes Verfahren: Normale nichtgespeicherte Milz wurde in Kar minplasma gesetzt. Dabei wurde das Karminplasma nur bis zur ersten, selten bis zur zweiten Umbettung verwandt und dann das Gewebestück wieder in normales Plasma zurückgebettet. Dieses Verfahren führte zu dem angestrebten Erfolg.

Bei dem Zusatz von Tumorenplasma zum normalen Plasma kam solches von Tieren mit dem Flexner-Jobling-Carcinom

und Tieren mit dem Jensen'schen Rattensarkom in Anwendung. Es treten gegenüber den in normales Plasma implantierten Kulturen alle Vorgänge beschleunigter auf. Dafür sind die Stücke aber auch früher erschöpft und verfallen dann bald der Degeneration. Als erwähnenswert darf vielleicht noch die Vermehrung der eosinophilen und der polynukleären Granulozyten angeführt werden.

In einer Versuchsreihe, Stoffwechselstudien an Gewebekulturen von A. Krontowski und I. A. Bronstein, dienten als Gewebematerial Milz und Nierenfragmente junger und älterer Kaninchen. Dabei zeigte es sich, daß die Nieren- und Milzkulturen 5 Tage alter Kaninchen am besten in unverdünntem Plasma 6 Monate alter Kaninchen wuchsen, welches auf übliche Weise in abgekühlten paraffinierten Reagenzgläschen gewonnen worden war. Bei der Verwendung von Organteilchen aus Milz und Niere bereits 6 Monate alter Kaninchen, die erfahrungsgemäß in diesem Alter wenig, beziehungsweise gar kein Wachstum mehr zeigen, wurde bei den Milzexplantaten gewöhnliches Wachstum erzielt. In einigen Nierenkulturen begann Hineinwachsen einzelner Fibroplasten ins Plasma, in einem Präparate konnte Hineinwachsen vereinzelter Epithelstreifen festgestellt werden, bei den übrigen fehlten die gewöhnlichen Wachstumsmerkmale. Als Medium war eine Mischung homogenen, von einem gleichalterigen Tiere stammenden Plasmas und Tyrode-Lösung zu gleichen Teilen in Anwendung gebracht worden.

Bei einem in dieser Arbeit noch angeführten Versuch der Explantation eines Mäusecarcinoms kamen als Gewebe kleine aus dem peripheren Teil 3 bis 4 Wochen alter Geschwülste geschnittene Stückchen zur Verwendung. Als Nährboden diente Mäusemilzextrakt mit Zusatz von Kaninchenplasma durch ein gleiches Volumen Tyrodelösung verdünnt. Es gelang auf diese Weise, echtes Wachstum des Carcinoms zu erzielen.

Bei der Züchtung von Thymusgewebe zur Klärung gewisser, die Retikulumzellen und Thymozyten betreffender Fragen wurden als Organe die Thymusdrüsen sehr junger Kaninchen (einige Tage bis zu 1½ Monate) entnommen, da ja der Thymus erwachsener Tiere, der bekanntlich mit zunehmendem Alter einer physiologischen Involution unterliegt, von Fettgewebe durchwachsen und zu arm an Parenchym wird, bei der Explan-

tation fast ausschließlich nur Wachstum von Bindegewebe zeigen würde. Mit der Schere in Ringerlösung zerkleinerte Stückchen der Thymusdrüsen wurden in einem Tropfen homogenen Plasmas, welches von einem erwachsenen, am besten weiblichen Kaninchen gewonnen war, angesetzt.

Verschiedene Kulturen wurden 5 bis 6 Tage nach dem Ansetzen in einen Tropfen frischen Plasmas, nachdem sie 1 bis 1½ Stunden in Ringerlösung gut gespült waren, angesetzt. Ein Zusatz von Knochenextrakt, der eine starke Reizwirkung (Maximow 1923) auf lymphoide Gewebe ausüben soll, brachte hier keinen Wachstumsunterschied, da eben das sehr junge Gewebe von fast noch embryonalem Charakter soviel Eigenkräfte besitzt, daß es sich ohne jeglichen ergänzenden Faktor von sich aus üppig entwickeln kann.

In einer Arbeit von Hans Loewenthal „Ueber Kulturen von Milchflecken des Rattennetzes in vitro" zeigt sich ebenfalls, daß das gezüchtete Gewebe — die sogenannten Milchfleckchen — in Plasma mit oder ohne Zusatz von Extrakt, in diesem Falle kam Knochenmarkextrakt zur Verwendung, keinen prinzipiellen Wachstumsunterschied erkennen ließ, wenn auch die Menge der ausgewanderten Zellen durch den Zusatz günstig beeinflußt wurde.

Bei der Wahl der zu züchtenden Gewebe wurden von Katzenstein Versuche in vitro mit der Allantois vorgenommen. Als Material wurden im Gasofen bebrütete Hühnereier benutzt. Nach 4 bis 6 Tagen der Bebrütung erfolgte nach dem Harrison-Carrel'schen Verfahren Herausnahme des gut faßbaren extraembryonal gelegenen freien Teiles der Allantois. Gezüchtet wurde in Hühnerplasma oder Salzlösungen, bezw. in Gemischen von beiden mit und ohne Zusatz von Embryonalextrakt, der entweder autogen oder homogen war. Als Salzlösungen kamen Ringer'sche Lösung oder Locke-Lewis-Lösung mit und ohne Zusatz von Dextrose in Anwendung. Das Hühnerplasma stammte von 20 Monate alten Hennen, die 24 Stunden vor der Blutentnahme zur Vermeidung zu reichlicher Fettkugelbildung im Plasma hungern mußten. Dabei zeigte es sich: Das in einem früheren Zeitpunkt der Bebrütung (4 Tage) entnommene Explantat, das zunächst mesenchymatöses Wachstum zeigt, ergibt in einem etwa späteren Stadium der Züchtung (2 bis 3 Tage) dasselbe Bild, wie das in einem späteren Stadium

der Bebrütung (6 Tage) entnommene Explantat, das sofort epitheliales Wachstum erkennen läßt. Salzlösungen sind für die Züchtung des Gewebes in den ersten 8 Tagen gleich gut verwendbar. Durch die schnellere Abscheidung des Detritus in den Salzlösungen wird die Uebersicht zuweilen gestört. Zusatz von Embryonalextrakt zum Medium fördert das Wachstum der Allantois nicht, sondern erschwert nur die Lebendbeobachtung infolge der starken Vermehrung der Ausscheidungsprodukte.

Ueber Gewebekulturen der Lunge berichtet F. I. Lang. Als Material dienten kleinste, von der Pleura befreite periphere Lungengewebsstückchen gesunder, junger oder erwachsener Kaninchen. Als Nährmedium wurde homogenes Plasma junger 2 bis 3 Monate alter Kaninchen gewählt, das mit Ringer'scher Lösung und Wasser im Verhältnis 3:1½:¾ (Plasma, Ringer, Wasser) verdünnt wurde. Zum Plasma wurde stets eine gleiche Menge frisch bereiteten Extraktes 13 bis 15 Tage alter Embryonen oder Knochenmarkextrakt eines ausgewachsenen, zumeist schwangeren Kaninchens zugefügt. Bei diesem Versuch, der in erster Linie der Ergründung der morphologischen Stellung und Histogenese der Alveolarphagozyten diente, ließ sich feststellen, daß dieselben nach ihren morphologischen Aeußerungen und Erscheinungen ihres Zellebens richtige bindegewebige, histiozytäre, amöboide, phagozytäre und speichernde Zellelemente, wie sie uns als Makrophagen Matschnikoffs, als Polyblasten Maximows aus dem Entzündungsfelde oder als mobilisierte Retikulumzellen in Gewebskulturen von Lymphdrüsengeweben (Maximow) begegnen, darstellen.

Weitere Versuche aus Lungenexplantaten Dauerkulturen und vor allem Reinkulturen gleichartiger Zellarten zu züchten, wurden von E. Haagen angestellt. Die Lungenexplantate, die jungen nur 4 Wochen alten Kaninchen entnommen wurden, wurden in einem Medium gezüchtet, für welches Plasma und Milzextrakt gleichalter Kaninchen zur Verwendung gelangte, da von E. Haagen beobachtet worden war, daß für ein langanhaltendes Wachstum von Kaninchengewebekulturen nur derartiges junges, an Wachstumsstoffen noch besonders reiches Material geeignet ist.

Ebenso wie Kaninchenkulturen verhalten sich in dieser Hinsicht die Hühnergewebe, welche auch am besten und längsten in jungen Kulturmedien gedeihen. Im Gegensatz dazu

stehen Mäuse- und Rattengewebe, für die E. Haagen keine deutlichen Unterschiede in der Wachstumsstärke bei Verwendung von Plasma und Extrakten alter oder jüngerer Tiere finden konnte. Die Plasmabereitung geschah stets unter Zusatz des die Gerinnung hemmenden Heparins. Soweit Dauerkulturen angestrebt wurden, mußten die Lungenkulturen alle 2 Tage umgesetzt werden.

Diesen Untersuchungen wurden noch weitere Versuche angegliedert:

1. Züchtung solcher Lungenexplantate, zu deren ersten Züchtungsmedium einmal Tuberkelbazillen hinzugefügt worden waren.

2. Züchtung von Lungenkulturen eines Kaninchens, welches 2 Tage vorher intravenös mit einer Aufschwemmung von Tuberkelbazillen infiziert worden war. Zur Benutzung gelangte ein boviner, für Kaninchen nur wenig virulenter Stamm.

Es gelang sowohl aus den gesunden, als auch aus den tuberkulös infizierten Lungenexplantaten langlebige Kulturen zu züchten, wobei es für den Verlauf der Züchtung gleichgültig war, ob die tuberkulöse Infektion bereits in vivo oder erst in vitro erfolgt war. Eine Vermehrung der Bazillen innerhalb der Zellen konnte nicht sichergestellt werden, wenngleich die Möglichkeit vorhanden ist. Den in vivo sich abspielenden Vorgängen konnten äquivalente in vitro gegenüber gestellt werden.

Als in vitro-Kulturen wurden auch menschliche Leukozyten verwandt, die durch Zentrifugieren am besten von den roten Blutkörperchen getrennt werden können. Als Medium dient am besten autogenes Plasma, dem Extrakt menschlicher Embryonen beigefügt werden kann. Dies gilt für normales Blut. Für das Anlegen von Kulturen von Leukaemikern zeigt es sich aber, daß infolge der fermentativen Tätigkeit der Myeloblasten Verflüssigung des Fibrins des Menschenplasmas eintritt. Am besten ist es, wie eine lange Versuchsreihe lehrt, die weißen Blutkörperchen von Leukaemikern in ein Gemisch von Menschen- oder Kaninchenplasma auszupflanzen, wobei ein gewisser Zusatz von Erythrozyten wünschenswert erscheint.

Weitere Züchtungsversuche, und zwar ebenfalls von menschlichen Leukozyten, die sowohl von gesunden, als auch von an lymphatischer Leukaemie erkrankten Spendern stamm-

ten, kamen durch A. D. Timofejewsky und S. W. Benewolenskaja zur Durchführung.

Das Gerinnsel der weißen Blutkörperchen wurde in Ringerscher Lösung gut abgespült und in kleine Stückchen zerschnitten, die als Auspflanzungsmaterial dienten. Als Nährboden für die Kulturen kamen verschiedene Zusammenstellungen in Anwendung. Zum Teil fand das Plasma des erkrankten Spenders, zum Teil des gesunden Menschen und dann auch normales Kaninchenplasma Verwendung. Außerdem wurden fast immer Kombinationen von Menschenplasma und Kaninchenplasma präpariert, welche einen besonders guten Nährboden abgaben. Zu vielen Kulturen wurde ferner Extrakt menschlicher Embryonen im Alter von 2 bis 5 Monaten, verdünnt in Tyrodelösung, im Verhältnis von 1:10 hinzugefügt.

Ganz groß angelegte Arbeiten Maximows berichten über dessen Erfahrungen bei der Züchtung von Blutleukozyten. Von Säugern ist das Blut des Meerschweinchens, des Kaninchens und des Affen untersucht worden, von Vögeln das Blut des Huhnes. Die Auspflanzung fand auf Objektträgern oder in Carrel'schen Kulturflaschen unter Zusatz von Embryonalextrakt von Tieren derselben Gattung oder Extrakt aus entzündetem Gewebe statt. Mittels ständiger Erneuerung des Nährmediums und Entfernung der Stoffwechselprodukte durch Spülung mit Ringerscher Flüssigkeit gelang es, das Leben der Zellen in vitro längere Zeit — über einen Monat — zu unterhalten.

Freie Exsudatzellen zu züchten, wurde von Wjereszisky zum ersten Male versucht. Als Versuchstier wählte er ein Kaninchen, dem die Bauchhöhlenflüssigkeit mit einer sterilen Pipette abgesogen wurde. Die Kulturen wurden in mit Wasser verdünntem Kaninchenplasma unter Zusatz von Knochenmarkextrakt angesetzt. Die längste Lebensdauer betrug 10 Tage bei zweimaliger Umbettung.

Hans Hirschfeld züchtete eben diese Zellen aus der normalen Bauchflüssigkeit der Ratten, da diese Tiere, ebenso wie die Mäuse, ein überaus zellreiches Exsudat ohne jede Reizung der Bauchhöhle durch Injektion reizauslösender Mittel liefern. Die Kulturen wurden ausschließlich in Rattenplasma ohne Zusatz irgendwelcher Substanzen gezüchtet und konnten sie ohne Umbettung bis zu 7 Tagen am Leben erhalten werden.

Die Frage der Verwendung von Menschenplasma als Zucht-

medium für in vitro-Kulturen ist schon des öfteren erörtert worden und wird von den verschiedensten Forschern (Carrel, Hadda, Awrorow, Timofejewsky) seine schnelle Verflüssigung, wie das ja auch bei einem der oben angeführten Versuche schon erwähnt wurde, als besonderer Nachteil empfunden. P. Caffier konnte sich bei seinen Versuchen mit Blutkulturen nicht ganz davon überzeugen. Er hatte im Menschenplasma im Gegenteil ein recht gut brauchbares Medium gefunden. Die Verflüssigung trat zunächst, genau wie bei anderen Plasmaarten auch, an der Peripherie auf und war selbst bei 10 Tage alten Kulturen noch nicht bis zum Centrum vorgedrungen. Caffier bringt die Frage der Verflüssigung in erster Linie in Abhängigkeit des zum Versuch verwendeten Materials. So tritt bei Züchtung weißer Blutkörperchen Verflüssigung ziemlich spät ein, während bei Explantation von Endometriumstückchen in reines Menschenplasma beispielsweise schon nach sehr kurzer Zeit Verflüssigung beobachtet werden kann. Schwangerenplasma verflüssigt sich langsamer als normales Plasma.

Während das ständige Weiterzüchten von bindegewebsreichen Präparaten und damit von Fibroplasten ohne allzu große Schwierigkeiten sich über lange Zeit hinweg fortführen läßt, macht die Reinkultur von Epithel große Schwierigkeiten, einmal wegen der immer drohenden Ueberwucherung durch die Fibroplasten und dann aber vor allem wegen der proteolytischen Eigenschaften des Epithels. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, versuchte Carrel aus gemischten Kulturen gewisse, scheinbar „reine" Teile herauszuschneiden. Doch ist es auf diese Weise nicht gelungen, eigentliche Reinkulturen von Epithel zu bekommen.

Kapel versuchte vergeblich die oft sehr großen Membranen von Nieren- und Mesonephroskulturen zu isolieren und weiter zu züchten. Entweder wurden sie schon nach einer Passage von Fibroplasten überwuchert oder es traten große Vakuolen auf und die Kultur zeigt kein weiteres Wachstum. Erst nach langen Versuchen ist es Kapel gelungen, zwei Epithelarten rein zu züchten und zwar bei Explantaten von Herden rein ektodermaler Herkunft. Es wurden verwendet:

1. Gehirn, Kleinhirn,
2. Retina (Pigmentschicht)

10 bis 15 Tage alter Hühnerembryonen. Als Züchtungsmedium

für Cerebrum bezw. Cerebellum wurde Hühnerembryonalextrakt benutzt, der etwa zu einem Drittel mit Ringerlösung verdünnt war. Jeden 2. bis 4. Tag wurden die Kulturen umgesetzt. Als Kulturen müssen möglichst dünne Stückchen Verwendung finden. Es empfiehlt sich außerdem, Stückchen aus etwas tiefer gelegenen Schichten zu nehmen, da sich sonst leicht Fibroplasten aus der Pia mater beimengen können. Nach 24 Stunden waren amöboide, vakuolisierte, ganz unregelmäßige Zellen emigriert. Das Kulturmedium verflüssigte sich teilweise oder circulär. An den Stellen, wo keine Verflüssigung eingetreten war, sah man zahlreiche, feine, stark lichtbrechende Nervenfasern dem Explantat auswachsen. Die ausgewachsenen, lebhaft phagozytierenden (Karmin, Tuberkelbazillen) Zellen entsandten Hyaloplasmapseudopodien nach allen Richtungen. Die Teilungsvorgänge — es teilten sich auch isolierte Zellen — waren immer amitotisch. Oft sah man Kernteilung ohne nachfolgende Zellteilung. Man konnte beobachten, daß sich ihr Hyaloplasma ausdehnte und breite Verbindungen mit Nachbarzellen bildete. Doch bestand keine Neigung zu Gewebsbildung oder membranartiger Ausbreitung.

Nach 2 bis 3 Passagen ließ sich wohl noch Emigration dieser Zellen feststellen, aber schon in der zweiten Passage war von der Ausgangskultur ein für gewöhnliches Epithel charakteristisches Membranwachstum zu erkennen. Brachte man dann die Kultur, wie dies F i s c h e r empfiehlt, auf die Oberfläche des koagulierten Mediums, so erhielt man bald ein sehr lebhaftes Flächenwachstum und hatte so Epithelkultur rein erzielt, die sich nun bei entsprechender Sorgfalt weiterzüchten ließ.

Für die Explantation von Retinastückchen kamen ebenfalls 10 bis 13 Tage alte Hühnerembryonen zur Verwendung. Als Medium diente, wie oben, mit Ringerlösung im Verhältnis 2:1 verdünnter Hühnerembryonalextrakt. Schon nach 12 Stunden konnte im allgemeinen ein geringes Wachstum feiner, fibroplastenähnlicher, nicht pigmenthaltiger Zellen wahrgenommen werden. Es handelt sich anscheinend um ein Wachstum aus Ueberresten anderer Retinaschichten und nicht um echte Fibroplasten, da das Wachstum dieser Zellen schon nach einigen Passagen stark zurückging, bezw. ganz aufhörte. Echte Fibroplasten dagegen würden die Pigmentzellen rasch überwuchert haben. Neben diesen Zellen erscheinen viele mit schwarzem

Pigment beladene Wanderzellen, wahrscheinlich sogenannte „Klasmatozyten", die das Pigment phagozytiert haben. Zwischendurch wachsen auch schon kohlenschwarze, breit miteinander zusammenhängende Pigmentepithelzellen aus, die schließlich eine aus Epithzellen mit typischem Membranwachstum bestehende Kultur bilden.

Von Kapel wurden nun auf Grund dieser Erfahrungen weitere Versuche von Epithelzüchtung angestellt und zwar mit Magen-Darmepithel, mit der Schnabel- und Federnanlage bei Hühnerembryonen, mit Niere und Mesonephros. Alle diese Versuche scheiterten jedoch an der stets eintretenden Verflüssigung des Nährmediums, das in allen diesen Fällen aus gleichen Teilen Hühnerplasma und Embryonalextrakt bestand. Das verwendete Gewebe stammte je nach den Versuchen (es gab hier die mit dem Alter mehr oder weniger fortgeschrittene Entwicklung der notwendigen Organe den Ausschlag) von 5 bis 19 Tage alten Hühnerembryonen.

Ein Versuch, mit Pankreasgewebe gutes Epithelwachstum zu erzielen, gelang Hermann Pintus. Er benutzte das Pankreas eben geschlüpfter Hühnchen, das wegen seiner geringen Beimengung von Bindegewebe und seiner hauptsächlichsten Zusammensetzung aus Drüsenschläuchen sehr geeignet erschien. Auf dem Deckglas wurde ein Tropfen einer Mischung von 9 Teilen Hühnerblutplasma und 1 Teil Hühnerembryonalextrakt ausgebreitet. Nach erfolgter Gerinnung wird ein Drüsenstückchen von etwa 1 ccmm Größe darauf gebracht und mit einer dünnen Schicht Embryonalextraktes bedeckt. Alle 3 Tage wurden die Kulturen in Ringerscher Lösung ausgewaschen und in neues Medium umgesetzt. Gut wachsende Epithelkulturen, die bis zu 4 Wochen weiter gezüchtet werden konnten, waren der Erfolg dieses Versuches.

Durch das Verfahren der Gewebezüchtung und durch die Möglichkeit, Epithel in Reinkulturen zu erhalten, eröffneten sich dem Bestreben, das immer noch bestehende Dunkel der Entstehung bösartiger Tumoren und Zellwucherungen zu erhellen, neue Wege. Zu diesem Zweck wurden die mannigfaltigsten Züchtungsversuche eingeleitet. Eingehend befaßten sich damit Lambert und Hanes. Von 5 verschiedenen Tieren mit jeweils verschiedenem Immunitätscharakter wurde neben einem Normaltiere Blutplasma gewonnen und in allen diesen

Plasmen fanden sie gutes Wachstum eines in sie verpflanzten Rattensarkoms. Ein Unterschied gegenüber dem Wachstum in dem normalen Plasma bestand nicht.

In dieses Gebiet gehört auch die Arbeit von Losee und Ebeling, denen es gelang, in einer Mischung von menschlichem Plasma und Ringer'scher Lösung unter häufiger Waschung ein Osteosarkom des Menschen fast 2 Monate lang am Leben zu erhalten.

Maccabrunni versuchte Uteruscarcinom des Menschen zu züchten. Es scheiterte aber daran, den Tumor längere Zeit am Leben erhalten zu können, da das verwendete menschliche Plasma sehr schnell in der Kultur zur Verflüssigung kam. Diese Tatsache, es wurde bereits darauf hingewiesen, besonders aber die Verflüssigung des Plasmas durch Carcinomzellen und da wieder am meisten durch menschliche bösartige Geschwülste, wird von fast allen Forschern bestätigt. Diese Erfahrung gab Anlaß zu den mannigfaltigsten Mischungen von Nährmedien. So wuchsen Rattengeschwulstzellen nach Lambert und Hanes in einem Zusatzgemisch von Ratten- und Hühnerplasma. Rh. Erdmann züchtete mit gleichem Erfolg Hühnersarkomzellen in Entenplasma wie Hühnerplasma. Man kam durch diese Beobachtungen zu der Feststellung, daß es geradezu ein Merkmal der Geschwulstzellen sein müsse, artfremde Proteinkörper zu assimilieren, so daß man ohne weiteres dieselben (Geschwulstzellen) in speciesfremdes Medium einzupflanzen vermag.

Zur Züchtung von Mäusecarcinomzellen — es diente das Ehrlich'sche Mäusesarkom, sogenannter „Frankfurter Stamm", der in 100% bei Laboratoriumsmäusen angeht, für die Versuche — fand man als brauchbarstes Medium folgende Zusammensetzung: Gleiche Teile von 75prozentigem Rattenplasma mit 25prozentigem Hühnerplasma und Hühnerembryonalextrakt oder Proteosen nach Carrel und Baker. Auf diese Weise gelang es, außerordentlich intensives Wachstum zu erzielen, so daß es sogar ziemlich leicht infolge der Dichte zu centralen Nekrosen und in Anschluß daran zur Verdauung, und damit zur Verflüssigung des Plasmagerinnsels kam. Carcinomzellen wurden so über einen Monat lang gezüchtet.

Eine noch größere Wachstumsintensität konnte dadurch erreicht werden, daß man dem Medium normales homogenes

Gewebe, z. B. Muskelgewebe erwachsener oder auch embryonaler Tiere zusetzte und Kontakt zwischen beiden Stückchen herstellte. Dabei zeigt sich, daß keine normale Zellart — auch nicht heterogenes Gewebe z. B. wachsender embryonaler Hühnermuskel — in der Lage war, das vordrängende Wachstum der Carcinomzellen zu dämmen. Nach kurzer Zeit war das beigegebene Gewebe vollständig von den Geschwulstzellen infiltriert und dann überhaupt nicht mehr festzustellen.

Ein Zusatz von Gewebe ist, wie K a p e l zeigte, der ohne Gewebszusatz wochenlang züchten konnte, nicht unbedingt erforderlich. Doch stellt diese Methode eine große Erleichterung dar. Im Gegensatz zum Mäusecarcinom ist ein Gewebezusatz beim Flexner-Jobling-Rattencarcinom, wie L a s e r gezeigt hat, eine conditio sine qua non.

Etwas leichter und auch erfolgreicher gestaltet sich die Züchtung von Rous-Sarkomzellen, nachdem man jedoch auch hier erst die verschiedensten Versuche angestellt hatte, die immer wieder eintretende und zerstörend wirkende Verflüssigung auszuschalten. Zunächst versuchte man es mit Zusatz ungesättigter Säuren, Natrium-lenoleat, Eigelb. Die besten Resultate wurden nach Zusatz geringerer Mengen von Embryonalextrakt als sonst üblich erreicht, fußend auf der Ueberlegung, daß ja die Organextrakte auf das Menschenplasma verdauend einwirkende Enzyme enthalten.

Das frisch herausgenommene Sarkomgewebe wird in kleine Stücke von 1 bis 2 mm Seitenlänge geschnitten. Diese Fragmente werden in einen Plasmatropfen gebracht, der dann mit Embroynalextrakt versetzt wird. Nach einigen Stunden kommt es zur Auswanderung leukozytenähnlicher amöboider Zellen. Nach 24 Stunden ist das Gewebestück von einem dichten Kranz solcher Zellen eingefaßt. Zu diesem Zeitpunkt setzt die Ver dauung des Plasmas ein, die dann besonders stark nach einigen weiteren Passagen (von je 24 Stunden) in Erscheinung tritt. Das Stückchen wird nun langsam auf allen Seiten vom flüssigen Medium umgeben. Von diesem Zeitpunkt an wird das Explantat immer kleiner und das Auftreten der Verdauung tritt immer mehr und mehr an den Zeitpunkt kurz nach dem Umsetzen heran. Nun wird ein Muskelstückchen — am besten Brustmuskulatur des Huhnes — von der Größe des ursprünglichen Explantates der Kultur beigegeben und zwischen

diesem Stück und dem Sarkomgewebe Kontakt hergestellt. Das Muskelstück ist in Ringer'scher Lösung über einen Monat aufbewahrtes, dem Eisschrank entnommenes totes Gewebe. (Trotz wiederholter Züchtungsversuche konnte niemals Zellleben festgestellt werden.) Nach 48 Stunden ist bereits starke Infiltration des Muskelstückchens durch Sarkomstückchen sichtbar. Durch ständiges Teilen dieser Kulturen und Ansetzen der gewonnenen Stückchen mit neuem Muskelgewebe gelingt es, die Sarkomzellen, die dabei, wie Ueberimpfungen beweisen, ihre Bösartigkeit keineswegs verlieren, bis ins Unbegrenzte weiterzuzüchten. Die Züchtung wurde $3\frac{1}{2}$ Jahre fortgeführt, bis ein rein äußeres Ereignis dem Versuche ein Ende brachte.

Nach einer diesen Versuch als Vorbild nehmenden Methode gelang es, eine Dauerkultur eines Hühnermyxosarkoms anzulegen (Ren Kimura). Ein steril excidiertes Stückchen eines Hühnermyxosarkoms wurde in einem Medium von je einem Tropfen Hühnerplasma und Embryonalextrakt angesetzt. Einem Teil der Kulturen wurde ein Stückchen Herzembryonalgewebe zugesetzt und Kontakt zwischen den beiden Fragmenten hergestellt. Es zeigte sich jedoch hier, daß die Plasmaverflüssigung in den Kulturen sowohl mit als auch ohne Herzstückchen nur ganz geringgradig war. Doch ließen sich auf längere Zeit die Kulturen ohne Herzgewebe nicht weiter züchten, sondern starben in der 4. Generation ab, während die mit Herzgewebe immerzu gutes Wachstum zeigten. Es stellte sich nun heraus, daß der Zusatz — die Verflüssigung wurde mit der Zeit weniger heftig — nicht bei jeder Umsetzung in neues Medium notwendig wurde, sondern nur etwa alle 4 bis 5 Generationen. Auch dieser Tumor behielt seine Bösartigkeit bei, wie vorgenommene Transplantationen deutlich bewiesen.

In dem Bestreben der Entstehung der bösartigen Geschwülste auf den Grund zu kommen, stellte man reichlich Bemühungen an, Umwandlung normaler Zellen in solche mit bösartigem Charakter zu erreichen und so den Bedingungen für die Bösartigkeit nahezukommen. In diesem Bestreben gelang es nun A. Fischer durch Ueberimpfung von in vitro-Kulturen einen in allen seinen Grundzügen dem Rous-Sarkom genau gleichenden Tumor zu erzeugen. Kulturen embryonaler Hühnermilz wurden mit Arsenpentoxyd (As_2O_2) in starker Verdünnung (1:400 000) behandelt. Nach 11 Passagen wurde das As fort-

gelassen und die Kulturen in 8 Passagen normalen Mediums weitergeführt. Zwei dieser Kulturen auf ein Huhn überimpft, ergaben einen, wie schon erwähnt, dem Rous-Sarkom völlig gleichenden Tumor.

Bei weiteren in dieser Richtung geführten Versuchen ist es nochmals gelungen, einen Tumor in vitro zu erzeugen und zwar mittels Teer. Die Technik war in diesem Falle etwas modifiziert. Die Kulturen wurden nicht direkt dem Einfluß des Teeres ausgesetzt, sondern es wurde ein Plasma verwendet, welches von einem mit Teer vorbehandelten Tiere stammte. Dieses Tier erhielt in ca. achttägigen Intervallen viermal je 2 gtt. Teer intravenös und darauf noch zweimal je 2 gtt. subcutan. Es wurde reiner Teer verwandt, dessen kanzerogene Eigenschaften im Krebsinstitut der Charité (Blumenthal) in Pinselungsversuchen erprobt worden war. Das Tier hatte die Teerinjektionen gut vertragen und zeigte, außer einer geringen Abmagerung im Anschluß an die Injektionen keinerlei Merkmale irgendwelcher Schädigungen. Einige Tage nach der letzten Injektion wurde Plasma entnommen und in diesem „Teerplasma' Kulturen von embryonaler Milz angelegt. Gleich von Anfang an verflüssigten die Kulturen sehr stark, stärker als das bei den gewöhnlichen Milzkulturen, auch bei Zusatz von frischem embryonalen Herz, der Fall zu sein pflegt. Bereits nach 4 Passagen, am 8. Tage, wurden 2 dieser Kulturen einem gesunden Huhne eingeimpft. Nach 14 Tagen hatte sich an der Impfstelle ein kastaniengroßer Tumor entwickelt. Nach 21 Tagen starb das Tier. Die Sektion ergab außer des infiltrierend gewachsenen Primärtumors massenhaft Metastasen in Herz, Lungen, Leber und, was zu den Seltenheiten gehört, in der Milz. Der Tumor war ein Spindelzellensarkom. Er war transpantabel auf andere Hühner. Er verhielt sich in der Kultur, in der er sehr stark fibrinlösend wirkte, wie der Rous-Tumor und das oben erwähnte As-Sarkom, und war bisher auch durch zellfreies Virus, das aus überstehender Flüssigkeit aus einer Flaschenkultur gewonnen war, übertragbar.

Interessant ist es noch, daß die Malignität nur an die lebende Zelle gebunden ist, eine Tatsache, die sich aus nachstehendem Versuch klar ergibt. Auf Grund der Erfahrung, daß Gewebekulturen nach Bebrütung (24 Stunden) bei Zimmertemperatur längere Zeit aufbewahrt und am Leben erhalten

werden können, stellte man analoge Versuche auch mit Carcinomgewebe an. Kulturen des Mäusecarcinoms (Fischer 85. bis 89. Passage) wurden in einer Mischung ¾ Rattenplasma und ¼ Hühnerplasma + Hühnerembryonalextrakt gezüchtet und nach 24 Stunden Bebrütung bei 39 Grad C. im Dunkelraum bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Im Zeitraum von 8 bis 49 Tagen wurden je 2 Kulturen subcutan auf Mäuse überimpft. Bis zum 24. Tage gingen die Kulturen lückenlos an. Nach dem 24. Tage ist keine einzige Kultur mehr angegangen. In das Kulturmedium zurückversetzt, zeigten entsprechend der gemachten Erfahrung die Kulturen bis zum 25. Tage wieder echtes Wachstum, während nach dem 28. Tage keinerlei Wachstum mehr erfolgte. Die Krebszelle scheint also unter den gegebenen Bedingungen nach ungefähr 25 Tagen zugrunde zu gehen, und damit verliert sie ihre Bösartigkeit.

Ausgehend von der Tatsache, daß sich die Zellen in dem erwachsenen Organismus für gewöhnlich in einem Zustand der „proliferativen Ruhe' befinden, d. h. nur auf bestimmte Veranlassung hin — Verlust von Gewebeteilen, Zellersatz der durch ihre Funktion zugrundegegangenen Zellen — mit Proliferation antworten, suchte F i s c h e r in Zusammenarbeit mit anderen Forschern einen den Vorgängen in vivo entsprechende Methode zu schaffen. Auf diese Weise soll dann nicht mehr wie bisher eine Beschleunigung, sondern eine Verlangsamung, eine Hemmung des Zellwachstums, erzielt und so der im Organismus herrschende Gleichgewichtszustand zwischen den Zellen und dem interstitiellen Medium hergestellt werden; d. h. man muß zu erreichen suchen, die Reproduktionskraft der Zellen zu unterdrücken.

Als Material diente bei diesen Arbeiten hauptsächlich ein 8 Monate alter Stamm von fibroplastenähnlichen Zellen, der vom Knorpel abgeleitet war. In eine übliche Carrel-Flasche, 3,5 ccm D. Type, wurden 0,5 ccm Hühnerplasma und 1,0 ccm Tyrodelösung eingeführt. Ein Tropfen sehr verdünnten Embryonalextraktes wurde zugesetzt und der Inhalt der Flasche gut gemischt. Unmittelbar darnach wurde das kleine Gewebefragment eingeführt und wurde abgewartet, bis die Gerinnung eingetreten war. Hierauf wurde das Plasmagerinnsel mit 2 bis 3 ccm Tyrodelösung überschichtet, die man bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank für 1 bis 2 Stunden — je nach dem

Versuchszwecke — beließ. Alsdann wurde die Tyrode abgesaugt und 0,25 bis 0,5 ccm Hühnerplasma zugesetzt, das etwa 10% einer 0,1prozentigen Heparinlösung enthält. Die Flasche mit dem flüssigen Plasma kam dann 3 bis 4 Stunden in den Brutschrank. Hierauf wurde das Plasma wieder vollständig abgesaugt. Die Flasche wurde dann mit einer Gummikapsel verschlossen und weitere 2 bis 3 Tage ohne irgend welches flüssiges Medium über das geronnene Plasma zu geben, im Brutschrank aufbewahrt. Die Waschung mit Tyrode bezw. mit Plasma wurde wirksamer, wenn die Flüssigkeit durch dauerndes Hin- und Herneigen(nach Art der photographischen Schalen) über der Plasmaoberfläche bewegt wurde.

Eine Wachstumsperiode, d. h. die Periode zwischen zwei aufeinanderfolgenden Waschungen, dauert etwa 2 bis 3 Tage. Die Methode besteht also in der Hauptsache aus zwei alternierenden Phasen. Die eine, die etwa 5 Stunden dauert, geht darauf hinaus, das die Zellen umgebende Medium von angehäuften Stoffwechselprodukten zu befreien und mit einer neuen Nahrung zu versehen. Die andere Phase mit einer Dauer von 40 bis 70 Stunden ist eine Phase langsamen Zellwachstums.

Das Wachstum der Zellen geht nicht, wie bei der früheren Technik unter einer Decke von flüssigem Medium vor sich, sondern in einem trockenen Plasmagerinnsel. Die letzte Modifikation der Technik bedeutet für die Zellen eine bessere Gelegenheit, in ein gegenseitiges Abhängigkeitsverhältnis zu treten. Produkte, die von den Zellen secerniert werden, können die Zellen in weit höherem Maß beeinflussen, als wenn die Zellen von einem flüssigen Medium bedeckt wären. In diesem Falle, d. h. im flüssigen Medium, kommt es zu einer schnelleren Ausgleichung der entstehenden Unterschiede zwischen den Zellen und dem Medium.

Die Zellen werden bei dieser Technik mit einer Nahrung versorgt, die in Qualität nicht hinter der des Organismus zurücksteht. Auf diese Weise fortgesetzt können die Gewebsstückchen nicht nur leben, sondern auch in derselben Züchtungskammer mehrere Monate hindurch, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit, wachsen.

Zusammenfassung.

Bei dem Verfahren der Gewebezüchtung in vitro kommen verschiedene Nährmedien zur Verwendung, die ein Weiterleben der in sie verpflanzten Organteile ermöglichen:

1. Anorganische Medien,
2. Organische Medien
   a) autogene,
   b) homogene,
   c) heterogene Stoffe,
3. Gemischte Medien, d. h. Mischungen, die teils aus organischen, teils aus anorganischen Medien bestehen.
4. Anorganische Medien, denen chemisch darstellbare, standardisierte, den organischen in ihrer Zusammensetzung entsprechende Zusätze beigegeben sind.

Die anorganischen Medien eignen sich vor allem sehr gut für die Lebendbeobachtung. Doch können sie auch als Nährmedien benutzt werden, falls es sich um embryonale oder sehr junge Explantate handelt, die die lebensnotwendigen Substanzen als Reservekräfte noch in sich haben. Im übrigen sind sie als Aufbewahrungsmedium von Gewebestücken für kürzere Zeit als Verdünnungsmittel für andere Medien und als Spülungsflüssigkeit zum Auswaschen der Stoffwechselprodukte brauchbar.

Autogene und homogene Medien dienen als bestes Nährmedium bei der Züchtung von Warmblüterorganen. Lohnend ist in vielen Fällen ein Zusatz von Embryonalextrakt. Sie sind in den meisten Fällen die Medien der Wahl.

Bei der Züchtung von Kaltblüterorganen und Organteilen anderer niederer Vertebraten kann man sich des autogenen und homogenen, aber auch mit ganz ausgezeichnetem Erfolg des heterogenen Mediums bedienen, was besonders deshalb von Vorteil ist, weil die Gewinnung der nötigen Mengen autogenen bezw. homogenen Plasmas bei der Kleinheit dieser Tiere erhebliche Schwierigkeiten bereitet. Auch hier ist der Zusatz von Gewebeextrakt von Vorteil.

Für die Züchtung von Tumoren erscheint die Verwendung heterogenen Plasmas wegen der Möglichkeit der Tumorzellen artfremde Proteine zu assimilieren, günstig. Zweckmäßig ist der Zusatz einer kleineren Menge von Gewebeextrakt als ge-

wöhnlich und der Zusatz eines normalen Organstückchens. (Am besten Muskelgewebe.) Das zugesetzte Stückchen soll dem Explantat weniger zur Ernährung dienen, als vielmehr den von diesem auswachsenden Zellen eine Stütze geben.

Die bisher angewandte Technik erreichte infolge der reichlichen Zufuhr wachstumsfördernder Stoffe in Form von Embryonalextrakt ein intensives Wachstum, das den physiologischen Vorgängen im Organismus, wo sich die Zellen in einem Stadium der „proliferativen Ruhe" befinden, allerdings nicht ganz entspricht. Durch eine neue Technik ist es nun gelungen, Gewebekulturen praktisch ohne Embryonalextrakt zu züchten. Dadurch wird ein langsames aber ständiges, den Vorgängen im Organismus näherkommendes Wachstum der Gewebezellen erreicht. So besteht infolge der gegenüber den früheren Verfahren herabgeminderten Teilungsgeschwindigkeit und der Vergrößerung der Reaktionsbreite die Möglichkeit, auch kleinste Einflüsse wahrzunehmen, die bisher unter der Beobachtungsgrenze lagen.

*

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, dem Referenten, Herrn Professor Dr. Georg Herzog, Direktor des Pathologischen Institutes, für die Stellung des Themas, Herrn Oberarzt Dr. Schopper für die mannigfache Unterstützung meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literaturangabe.

Biscegli V. und Juhasz-Schöffer: Die Gewebszüchtung in vitro.

Bermann, Gottfried: Ueber die Infektion von Knochenmarkskulturen jugendlicher und ausgewachsener Meerschweinchen mit Staphylococcus pyogenes aureus.
Arch. f. experiment. Zellforschung. Bd. 1 Heft 2.

Caffier, P.: Ueber die Umwandlungsfähigkeit der weißen Elemente des normalen menschlichen Blutes bei in vitro Kultivierung.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 4 Heft 3.

Chlopin, G. Nikolaus: Studium über Gewebskulturen in artfremden Plasma.
Zeitschr. f. mikroskop. anatom. Forschung. Bd. 2, 1925.

Erdmann, Rh.: Einige grundlegende Ergebnisse der Gewebezüchtung aus den Jahren 1914 bis 1920.
Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte Bd. 23. 1921.

Erdmann, Rh., Hilde Eisner und Hans Laser: Das Verhalten der fötalen, postfötalen und ausgewachsenen Rattenmilz unter verschiedenen Bedingungen.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 2. Heft 4.

Erdmann, Rh. und Ernst Schmerl: Ueber die Atmung gezüchteter und ungezüchteter Froschhaut.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 2. Heft 3.

Fischer, A.: Ueber Gewebezüchtung.

Fischer A.: Züchtung von Karzinomgewebe in vitro.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 6.

Fischer, A. und Fritz Demuth: Eiweißabbauprodukte als wachstumsfördernde Substanzen.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 5 Heft 1/2.

Fischer A. und Raymond C. Parker: Dauerzüchtung in vitro ohne Wachstumsbeschleunigung.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 8 Heft 2.

Haagen, E.: Das Verhalten von Lungengewebskulturen gegenüber Tuberkelbazillen.

Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 5 Heft 1/2.

Hirschfeld, Hans: Züchtungsversuche mit freien Exsudatszellen.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 4 Heft 3.

Ishikawa Shin-Ishi und Shiro Shimomura: Ueber die Phagozytose und Bewegung der Epithelien der Harnblase, der Gallenblase und der Zunge des Frosches in vitro.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 2 Heft 1.

Kapel, O.: Ueber Reinkulturen von Epithel in vitro.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 4 Heft 2.

Kapel, O.: Einige Untersuchungen über das Verhalten des Epithels in vitro.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 8. Heft 1.

Katzenstein, Walter F.: Studium über die Allantois und ihre Kultur in vitro.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 1. Heft 2.

Kimura, Ren: Züchtung von Hühnermyxosarkom in vitro.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 7. Heft 4.

Krontowski, A. A. und I. A. Bronstein: Stoffwechselstudien an Gewebskulturen.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 3. Heft 1.

Krontowski, A. A. und M. C. Jazimirska - Krontowska: Stoffwechsel an Gewebskulturen.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 5 Heft 1/2.

Kunjantzew, A.: Studien an Gewebskulturen in vitro.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 4. Heft 3.

Laser: Erzeugung eines Hühnersarkoms in vitro mittels Teer.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 6.

Loewenthal, Hans: Ueber Kulturen von Milchflecken des Rattennetzes in vitro.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 3. Heft 1.

Lang, F. I.: Ueber Gewebskulturen der Lunge.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 2. Heft 2.

Meyer, Hertha: Ueberleben von Mäusekarzinomzellen in vitro bei Zimmertemperatur.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 7. Heft 2.

Mitsuhashi, H.: Pigmentierung und Verfettung der Epithelzellen der Froschhaut in in vitro Kulturen.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 2. Heft 3.

Pintus, Hermann: Pankreas in der Gewebezüchtung.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 8. Heft 1.
Ssipowsky, P. W.: Ueber in vitro Kulturen der Kaninchennebenniere.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 8. Heft 2.
Timofejewsky, A. D. und S. W. Benewolenskaya: Neue Beobachtungen an lymphoiden Zellen der amöboiden und lymphatischen Leukaemie in Explantation.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 8. Heft 1.
Tschassownikow, N.: Ueber die in vitro Kulturen des Thymus.
Arch. f. experiment. Zellforsch. Bd. 3. Heft 3.

Lebenslauf.

Ich, Otto Kraus, wurde geboren am 7. Februar 1904 zu Bayreuth als Sohn des Studienprofessors August Kraus. Nach vier Jahren Volksschule trat ich im September 1914 in das humanistische Gymnasium zu Amberg ein, dem ich 6 Jahre angehörte. Infolge Versetzung meines Vaters nach Würzburg mußte ich einen Anstaltswechsel vornehmen. Ich bezog das humanistische Neue Gymnasium zu Würzburg, in dem ich dann auch im Frühjahr 1923 mit Erfolg das Maturitätsexamen ablegte. Ich widmete mich dem Studium der Medizin an der Universität Würzburg. Nach Ablauf der ersten 5 Semester legte ich die medizinische Vorprüfung und nach weiteren 5 Semestern das medizinische Staatsexamen, beides in Würzburg, ab. Mein praktisches Jahr verbrachte ich am Städtischen Krankenhaus Schwäbisch-Gmünd, wo ich auch nach erlangter Approbation als 2. Assistent bis zu meinem Eintritt in das Pathologische Institut der Universität Gießen verblieb, dem ich seit 15. September 1929 angehöre.